

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



<b>(51) 国際特許分類6</b> C12N 15/12, 5/10, A61K 31/70, G01N 33/563, C07K 14/82, 16/32	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO99/33977</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 1999年7月8日(08.07.99)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP98/05809  <b>(22) 国際出願日</b> 1998年12月22日(22.12.98)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平9/356895 1997年12月25日(25.12.97) JP  <b>(71) 出願人 ; および</b> <b>(72) 発明者</b> 伊東恭悟(ITO, Kyogo)[JP/JP] 〒841-0205 佐賀県三養基郡基山町けやき台2-25-9 Saga, (JP) <b>(72) 発明者 ; および</b> <b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</b> 七條茂樹(SHICHUO, Shigeki)[JP/JP] 〒830-0003 福岡県久留米市東櫛原町47-3-608 Fukuoka, (JP) 今井康久(IMAI, Yasuhisa)[JP/JP] 〒830-0006 福岡県久留米市南薫西町2000-1-105 Fukuoka, (JP)	<b>(74) 代理人</b> 弁理士 青山 稔, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)  <b>(81) 指定国</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  添付公開書類 国際調査報告書	
<b>(54)Title: TUMOR ANTIGEN PROTEIN, GENE THEREOF, AND UTILIZATION THEREOF</b>  <b>(54)発明の名称 腫瘍抗原タンパク質及びその遺伝子並びにその利用</b>  <b>(57) Abstract</b> A DNA comprising the base sequence represented by SEQ ID NO:1 or a DNA hybridizing with a DNA comprising the base sequence represented by SEQ ID NO:1 under stringent conditions and encoding a protein having activities as a tumor antigen; an expression plasmid bearing the above DNA; a product of transformation therewith; a tumor antigen protein produced as a result of expression of the above DNA; an antibody against the above protein; and the utilization thereof for the remedy, prevention or diagnosis of tumors.		

(57)要約

配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNA又は配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ腫瘍抗原としての活性を有するタンパク質をコードするDNA、該DNAを有する発現プラスミド、該プラスミドで形質転換された形質転換体、該DNAが発現することにより生産される腫瘍抗原タンパク質、該タンパク質に対する抗体、並びにそれらの腫瘍の治療、予防又は診断への利用。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール
AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
BJ	ベナン	HR	クロアチア	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CF	中央アフリカ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IN	インド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IS	アイスランド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IT	イタリア	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CM	カメルーン	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CN	中国	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
CZ	チェコ	KR	韓国	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
EE	エストニア						

## 明 細 書

## 腫瘍抗原タンパク質及びその遺伝子並びにその利用

## 5 技術分野

本発明は、新規な腫瘍抗原タンパク質及びその遺伝子、該腫瘍抗原タンパク質に対する抗体、並びにこれらの物質を用いて腫瘍を治療、予防又は診断する方法に関する。

## 10 背景技術

生体による腫瘍の排除には免疫系、特にT細胞が重要な役割を果たしていることが知られている。実際、ヒトの腫瘍局所には腫瘍細胞に対して傷害活性を示すリンパ球の浸潤が認められ(Arch. Surg., 126:200-205, 1990)、メラノーマからは自己の腫瘍細胞を認識する細胞傷害性T細胞(CTL)が比較的容易に分離されている(Immunol. Today, 8:385, 1987、J. Immunol., 138:989, 1987、Int. J. Cancer, 52:52-59, 1992等)。また、T細胞移入によるメラノーマ治療の臨床結果も腫瘍排除におけるT細胞の重要性を示唆している(J. Natl. Cancer Inst., 86:1159, 1994)。

CTLが自己の腫瘍細胞を攻撃する際の標的分子については長い間不明であったが、最近の免疫学及び分子生物学の進歩により次第に明らかになってきた。すなわちCTLは、T細胞受容体(TCR)を用いて、腫瘍抗原ペプチドと呼ばれるペプチドと主要組織適合遺伝子複合体クラスI抗原(MHCクラスI抗原、ヒトの場合はHLA抗原と呼ばれる)との複合体を認識することにより、自己の腫瘍細胞を攻撃していることが明らかとなった。

この腫瘍抗原ペプチドは、腫瘍に特有のタンパク質、すなわち腫瘍抗原タンパク質が細胞内で合成された後、プロテオソームによって細胞質内でペプチドに分解されることによって生成される。一方、小胞体で形成されたMHCクラスI抗原(HLA抗原)は、上記の腫瘍抗原ペプチドと結合し、シスゴルジを経て成熟側のトランスゴルジへと移動し、細胞表面に運ばれて抗原提示される。この抗原

提示された複合体を腫瘍特異的なCTLが認識し、細胞傷害作用やリンフォカインの産生を介して抗腫瘍効果を示す（臨床免疫，27 (9):1034-1042, 1995)。このような一連の作用の解明に伴い、腫瘍抗原タンパク質又は腫瘍抗原ペプチドをいわゆる癌ワクチンとして利用することにより、腫瘍患者の体内の腫瘍特異的なCTLを増強させ、腫瘍を治療することが可能となった。

この腫瘍抗原タンパク質としては、1991年に T. Boon らが初めてMAGEと名付けたタンパク質をヒトメラノーマ細胞から同定し (Science, 254:1643-1647, 1991)、またその後、いくつかの腫瘍抗原タンパク質がさらにメラノーマ細胞から同定されている。

今までに同定された腫瘍抗原タンパク質は、T. Boonらの総説 (J. Exp. Med., 183, 725~729, 1996) に記述されているように、以下の4つのカテゴリーに分けることができる。

1つ目のカテゴリーに含まれる腫瘍抗原タンパク質は、正常組織では精巣でのみ発現しており、腫瘍組織ではメラノーマ、頭頸部癌、非小細胞性肺癌、膀胱癌などに発現が認められる一群のタンパク質である。このカテゴリーの腫瘍抗原タンパク質としては、上記のMAGE、その12種類以上の類似するファミリーを形成するタンパク質群 (J. Exp. Med., 178:489-495, 1993)、BAGE (Immunity, 2:167-175, 1995) 及びGAGE (J. Exp. Med., 182:689-698, 1995) があり、いずれもメラノーマ細胞から同定されている。

しかし、このカテゴリーの腫瘍抗原タンパク質は、メラノーマでは高発現しているものもあるが、その他の種類の腫瘍ではその腫瘍の患者のうち10%から30%程度にしか発現しておらず、種々の腫瘍の治療や診断に広く応用することはできない。

2つ目のカテゴリーに含まれる腫瘍抗原タンパク質は、正常組織ではメラノサイト、網膜でのみ発現しており、腫瘍組織ではメラノーマのみで発現が認められる一群のタンパク質である。これらの組織特異的なタンパク質は腫瘍細胞のメラノーマに強度に発現していることから、メラノーマに特異的な腫瘍抗原タンパク質として機能している。このカテゴリーの腫瘍抗原タンパク質としては、チロシナーゼ (J. Exp. Med., 178:489-495, 1993)、MART-1 (Proc. Natl. Acad. Sci.

USA, 91: 3515, 1994)、g p 1 0 0 (J. Exp. Med., 179:1005-1009, 1994)、g p 7 5 (J. Exp. Med., 181:799-804, 1995)があり、これらの遺伝子はいずれもメラノーマ細胞からクローニングされている。また、別途Melan-A (J. Exp. Med., 180:35, 1994)が同定されたが、MART-1 と同一の分子であった。

5       しかし、このカテゴリーの腫瘍抗原タンパク質は、メラノーマ以外の腫瘍では発現していないため、広く腫瘍の治療や診断に応用することはできない。

3つ目のカテゴリーに含まれる腫瘍抗原タンパク質は、腫瘍特異的な突然変異の結果、CTLに認識される腫瘍抗原ペプチドとして発現されるようになった一群のタンパク質である。このカテゴリーの腫瘍抗原タンパク質としては、突然変異したCDK4 (Science, 269 1281-1284, 1995)、 $\beta$ -catenin (J. Exp. Med., 183:1185-1192, 1996)、MUM-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:7976-7980, 1995)がある。CDK4、 $\beta$ -cateninでは、1つのアミノ酸変異により、ペプチドのMHCクラスI抗原結合親和性が増加し、T細胞に認識されるようになる。MUM-1では、突然変異により、通常は翻訳されないイントロン部位が翻訳されることにより生じるペプチドがT細胞に認識される。しかし、これらの突然変異の頻度は低いため、広く腫瘍の治療や診断に応用することはできない。

4番目のカテゴリーに含まれる腫瘍抗原タンパク質は、正常組織にも広範に発現しているが、CTLに認識されるタンパク質であり、P15 (J. Immunol., 154:5944-5955, 1995)がメラノーマ細胞から同定されている。

20       以上のような既知の腫瘍抗原タンパク質は、メラノーマのような限られた腫瘍でしか発現していないか、又は多くの種類の腫瘍で発現していてもその腫瘍の患者のうちの少数にしか発現していないため、種々の腫瘍の治療や診断に幅広く応用できるものではない。すなわち、腫瘍抗原タンパク質やその細胞内分解により生じる腫瘍抗原ペプチドを種々の腫瘍の治療や診断に応用するためには、メラノーマに比べて発生頻度が圧倒的に高い扁平上皮癌（食道癌、肺癌等）等に幅広く適用可能な腫瘍抗原の同定が必要である。これに関して、本発明者らは食道癌由来の扁平上皮癌細胞から腫瘍抗原タンパク質をコードする遺伝子のクローニングを試み、メラノーマ以外の腫瘍細胞からはじめて、腫瘍抗原タンパク質（SART-1）をコードする遺伝子のクローニングに成功している（国際公開第

97/46676号パンフレット)。

ところで、腫瘍の診断に関しては、現在、腫瘍関連抗原に対する抗体を用いることにより、ラジオイムノアッセイやE L I S Aなどによる血中抗原物質の検出、酵素抗体法や蛍光抗体法などの免疫組織化学法による組織細胞診、さらには腫瘍のイメージングなどが試みられている (Oncodevelopmental Markers, Fishman, W. H. ら著, Academic Press出版、1983年)。しかし現在使用されている主な腫瘍マーカーは良性疾患において偽陽性を示す頻度が決して低くなく、そのため腫瘍特異性の高い腫瘍抗原タンパク質の同定、及び該腫瘍抗原タンパク質に対する診断用の抗体の単離が望まれている。

さらに、前記のように特定の腫瘍抗原タンパク質、又は腫瘍抗原ペプチドを例えばワクチンのような形で用いる場合、当該腫瘍抗原タンパク質を発現しており、該腫瘍抗原タンパク質又はその腫瘍抗原ペプチドによる治療に反応しうる患者をあらかじめ診断・選定した上で、その患者に対して当該腫瘍抗原タンパク質又は腫瘍抗原ペプチドを適用することが望ましい。そのような対象患者の選定において、腫瘍特異性の高い腫瘍抗原タンパク質又はそれに対する抗体は非常に有用な診断薬となると考えられる。このような観点からも、より腫瘍特異性が高く、また幅広い腫瘍患者に適用可能な腫瘍抗原タンパク質、及び該腫瘍抗原タンパク質に対する抗体の同定が望まれている。

## 20 発明の開示

本発明の目的は、新規な腫瘍抗原タンパク質、遺伝子、又は該腫瘍抗原タンパク質に対する抗体、あるいはこれらの物質を用いて腫瘍を治療、予防又は診断するための方法を提供することにある。さらに詳しくは、本発明は、各種の腫瘍、特に扁平上皮癌等の治療や診断に幅広く利用できる、腫瘍特異性の高い腫瘍抗原タンパク質又はその対応する腫瘍抗原ペプチド、それらをコードするDNA、及びそれらを認識し結合する抗体を提供することを目的とする。

上記の目的を達成するために、本発明者らは食道癌由来の扁平上皮癌細胞株KE-4(以下、食道癌細胞株KE-4、あるいは単にKE-4と称す)を樹立し、また該KE-4において発現するMHCクラスI抗原であるHLA-A2601、HLA-A2402に拘束性の腫瘍

抗原ペプチドを認識するCTL（以下、KE-4CTLと称す）を樹立した（Cancer. Res., 55:4248-4253, 1995）。

つづいて、線維芽細胞株 VA-13細胞に、KE-4から作製したcDNAライブラリーの組換えプラスミドとHLA-A2601 cDNAの組換えプラスミドを同時にトランスフェクトし、そのトランスフェクタントにKE-4CTLを作用させ、IFN- $\gamma$ の産生量を測定することにより、KE-4CTLの活性化に関してスクリーニングした。該スクリーニングを繰り返した結果、新規な腫瘍抗原タンパク質をコードする遺伝子をクローニングすることに成功した。クローニングされた遺伝子のヌクレオチド配列を配列番号：1に示す。

次に、この新規な腫瘍抗原タンパク質をコードする遺伝子をGSTとの融合タンパク質を発現させるプラスミドベクターに導入し、大腸菌を形質転換することにより、本発明の新規な腫瘍抗原タンパク質とGSTとの融合タンパク質を調製した。該融合タンパク質をウサギに免疫することにより得られた抗体を用い、種々の細胞株及び組織に対するウエスタンブロット解析を行ったところ、精巣及び胎児肝を除く全ての正常組織、及びメラノーマ、白血病では発現が認められなかったが、検討した頭頸部扁平上皮癌の全例、食道扁平上皮癌の60%、肺扁平上皮癌の50%、及び肺腺癌の50%において、分子量約43キログルトンを有する本発明の新規な腫瘍抗原タンパク質の発現が認められた。さらに、前記ウエスタンブロット解析で陽性を示した癌細胞（本発明の腫瘍抗原タンパク質の発現している癌細胞）は、実際に腫瘍特異的CTLにより認識され傷害を受けることも明らかとなった。

以上のように、本発明の腫瘍抗原タンパク質は、種々の扁平上皮癌あるいは腺癌において特異的かつ高頻度で発現していることから、これらの癌患者の抗腫瘍免疫を活性化するための医薬として有用であると考えられる。また本発明の腫瘍抗原タンパク質に対する抗体は、癌患者の診断、対象患者の選定において、有効に利用できるものと考えられる。

なお本発明の約43キログルトンの腫瘍抗原タンパク質をコードするDNA（配列番号：1）のヌクレオチド配列は、国際公開第97/46676号パンフレットに記載の腫瘍抗原タンパク質SART-1をコードするDNA（国際公開第97/46676号

パンフレットの配列番号：2に記載)の、第1517位以降のヌクレオチド配列と一致する。しかしながら、本発明の腫瘍抗原タンパク質は、上記ウエスタンブロット解析において、種々の腫瘍組織及び腫瘍細胞中で分子量約43キロダルトンのタンパク質として検出されており、しかもその発現パターンは分子量約125キロダルトンと推定されるSART-1と一致していないことから、該SART-1とは別個に生体内(腫瘍組織、腫瘍細胞内)で発現しているものと考えられる。

本発明は、以上のような知見に基づき完成したものである。

即ち本発明の要旨は、以下の(a)又は(b)のDNA：

(a) 配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNA；又は

(b) 配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ腫瘍抗原としての活性を有するタンパク質をコードするDNAに関する。

本発明はまた、該DNAを有する発現プラスミド、該DNAが発現して得られる腫瘍抗原タンパク質、該腫瘍抗原タンパク質を認識する抗体及びそれらの利用に関する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、本発明の新規な腫瘍抗原タンパク質をコードする遺伝子とHLA-A2601のcDNAとをVA-13細胞へダブルトランスフェクトしたのち、HLA-A2601、HLA-A2402に拘束性の腫瘍抗原ペプチドを認識するCTL(KE-4CTL)と混合培養し、KE-4CTLが反応して産生した培養液中のIFN- $\gamma$ 量の測定を行った結果を示すグラフである(図中■)。図中□は、比較のために異なったタイプのHLAをコードするDNA(HLA-A0201cDNA)を用いてダブルトランスフェクトし、同様に測定した結果を示すものである。縦軸はIFN- $\gamma$ 量を、横軸はトランスフェクトした新規な腫瘍抗原タンパク質遺伝子の量を示す。

図2は、本発明の新規な腫瘍抗原タンパク質(約43kD)とGST(約27kD)との融合タンパク質(約70kD)に対する抗血清を用いて行ったウエスタンブロットにおける電気泳動の結果である。図2Aにおいて、Factor Xa(-)は本発明の腫瘍抗原タンパク質とGSTとの融合タンパク質をFactor Xaで処理しな



5 かった場合、また図中Factor Xa(+)はFactor Xで処理することにより融合タンパク質を切断した場合の結果を示す。図2Bにおいて、PBMCは健常人末梢血単核球を、KE4及びTE9は食道癌細胞株を、E95-24、E96-18、E96-34、E96-26及びE96-30は食道癌組織を、またKL79、KL80、KL81、KL82、KL83及びKL84は肺癌組織を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

10 本明細書中、本発明のDNAとは、新規な腫瘍抗原タンパク質をコードするものであり、配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNA、又は配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであって、かつ腫瘍抗原としての活性を有するタンパク質をコードするDNAである。なお、本明細書中では、本発明の腫瘍抗原活性を有する所望のタンパク質をコードするDNAを表現する際に、遺伝子なる語句も相互変換可能に用いる。

15 ここで「配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNA」は、後述の実施例に記載の方法に従ってクローニングすることができる。また、配列番号：1に記載の塩基配列の全部又は一部をハイブリダイゼーションのプロブ又はPCRのプライマーとして用い、例えば食道癌細胞株KE-4 (FERM BP-5955) 由来のcDNAライブラリーをスクリーニングすることによってもクローニングすることが可能である。該クローニングは、例えばMolecular Cloning : A Laboratory Manual第2  
20 版、第1-3巻、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989等の基本書を参考にして、当業者ならば容易に行うことができる。

さらに、配列番号：1に記載の塩基配列は、本出願人によるPCT出願の国際公開第97/46676号パンフレットに記載の腫瘍抗原タンパク質SART-1をコードするDNA (国際公開第97/46676号パンフレットの配列番号：2に記載) の第  
25 1517位以降の配列と一致する。該SART-1をコードするDNAを有するE. coli JM109 (K3) は、茨城県つくば市東1丁目1番3号、工業技術院生命工学工業技術研究所に、受託番号：FERM BP-5951で寄託されている (受託日：平成9年5月22日)。従ってこの寄託微生物中のプラスミドを利用するこ

とによっても、配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAを得ることが可能である。

5 本明細書において、「配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジेंटな条件下でハイブリダイズするDNA」とは、例えば配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAに対して1又は複数個の塩基の置換、欠失及び／又は付加を有するDNAのような、配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAに類似の塩基配列を有するDNAであって、配列番号：1に記載のDNAとストリンジेंटな条件下でハイブリダイズするDNAを指す。

10 該DNAは、例えば配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAの一部をプローブあるいはプライマーに用い、Molecular Cloning : A Laboratory Manual 第2版、第1-3巻、Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989等に記載の方法によって種々のcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより得ることができる。また、前記 Molecular Cloningに記載の部位特異的変異誘発やPCR法によっても、前記の如き配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAに対し  
15 て1又は複数個の塩基の置換、欠失及び／又は付加を有するDNAを製造することができる。

ここで、「ストリンジेंटな条件」とは、例えば、 $6\times\text{SSC}$  ( $20\times\text{SSC}$ は、 $333\text{mM Sodium citrate}$ 、 $333\text{mM NaCl}$ を示す)、 $0.5\%\text{SDS}$ 及び $50\%\text{ホルムアミド}$ を含む溶液中で $42^{\circ}\text{C}$ にてハイブリダイズさせた後、 $0.1\times\text{SSC}$ 、 $0.5\%\text{SDS}$ の溶液中で $68^{\circ}\text{C}$ にて洗浄するような条件、あるいは、中山ら著、バイオ実験イラストレイテッド②遺伝子解析の基礎、p. 148-151、秀潤社、1995年、に記載の条件等を指す。  
20

本明細書中、タンパク質に関して「腫瘍抗原としての活性を有する」とは、そのタンパク質が、細胞内分解により、MHCクラスI抗原 (HLA抗原) と結合してCTLにより認識される腫瘍抗原ペプチドを生じるという特性を有することを意味する。従って、「腫瘍抗原としての活性を有するタンパク質をコードするDNA」とは、それが発現したとき、細胞内分解により、MHCクラスI抗原 (HLA抗原) と結合してCTLにより認識される腫瘍抗原ペプチドを与えることができるDNAを指す。すなわち、該DNAが発現して生産されるタンパク質  
25

の細胞内分解により生じる部分ペプチドが、MHCクラス I 抗原と結合可能であり、MHCクラス I 抗原と結合して細胞表面に提示された場合、そのペプチド断片とMHCクラス I 抗原との複合体に対して特異的なCTLが結合して細胞傷害作用やサイトカインの産生が誘導されることになる。そのようなペプチド断片を生じるタンパク質をコードするDNAは、本発明における「腫瘍抗原としての活性を有するタンパク質をコードするDNA」である。

候補となるDNAが、「腫瘍抗原としての活性を有するタンパク質をコードするDNA」であり得るか否かを調べるには、例えば以下のような方法を用いることができる。

まず、アフリカミドリザル腎臓由来のCOS-7 (ATCC CRL1651) や繊維芽細胞VA-13 (理化学研究所細胞開発銀行) といった腫瘍抗原タンパク質を発現していない細胞に対し、候補となるDNAを有する発現プラスミドと、MHCクラス I 抗原をコードするDNAを有する発現プラスミドとをダブルトランスフェクトする。該トランスフェクトは、例えばリポフェクトアミン試薬 (GIBCO BRL社製) を用いたりリポフェクチン法などにより行うことができる。その後、用いたMHCクラス I 抗原に拘束性の腫瘍反応性のCTLを加えて作用させ、該CTLが反応して産生する種々のサイトカイン (例えばIFN- $\gamma$ ) の量を、例えばELISA法などで測定することによって、候補DNAが腫瘍抗原としての活性を有するタンパク質をコードするDNAであるか否かを調べることができる。特定のMHCクラス I 抗原をコードするDNAを有する発現プラスミドは、例えば、既知の方法 (中尾ら著, Cancer Res., 55:4248-4252 (1995)) で調製することができる。

本発明のDNAを用いる組換えDNA技術により、腫瘍抗原タンパク質を大量に製造することが可能である。本発明のDNAを発現して腫瘍抗原タンパク質を生産するには、例えば、前述のMolecular Cloning 等の多くの成書や文献に基づいて実施することができる。通常、発現させたいDNAの上流に、場合によっては転写を制御するプロモーター配列 (例えば、trp、lac、T7、SV40 初期プロモーター) 等の制御遺伝子を付加し、適当なベクター (例えばpSV-SPORT1など) に組み込むことにより、宿主細胞内で複製し、発現する発現プラスミドを作製することができる。次に発現プラスミドを適当な宿主細胞に導

入して形質転換体を得る。宿主細胞としては、大腸菌などの原核生物、酵母のような単細胞真核生物、昆虫、動物などの多細胞真核生物の細胞などが挙げられる。また、宿主細胞への発現プラスミドの導入法としては、リン酸カルシウム法、D E A Eーデキストラン法、電気パルス法などの公知の方法を用いれば良い。得られた形質転換体は、常法により該形質転換体に適した培地で培養することによって目的とするタンパク質を生産する。以上のようにして得られた腫瘍抗原タンパク質は、一般的な生化学的方法によって単離精製することができる。

また、本発明の腫瘍抗原タンパク質をコードするDNAを、例えばGST（グルタチオンS-トランスフェラーゼ）との融合タンパク質を発現させるプラスミドベクター（例えばpGEX-5X-3、ファルマシアバイオテック社製）に挿入して得られる発現ベクターも使用することができ、該発現ベクターを、例えば大腸菌DH5 $\alpha$ 等の宿主に導入して得られた形質転換体は、本発明の腫瘍抗原タンパク質とGSTとの融合タンパク質を産生することができる。このような融合タンパク質は、グルタチオンセファロース等を用いて容易に精製することができる。このようにして精製された融合タンパク質も、上記の腫瘍抗原としての活性を有し得るが、酵素Factor X等を用いてGSTを分離し、非融合型の腫瘍抗原タンパク質を得ることが望ましい。

このようにして得られる発現産物は、本発明のDNAによりコードされており、それが発現することにより生産されるタンパク質であって、細胞内分解により、MHCクラスI抗原と結合してCTLにより認識され得る腫瘍抗原ペプチドを生じるといふ、腫瘍抗原タンパク質としての特性を有する。

本発明は、配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNA又は配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ腫瘍抗原としての活性を有するタンパク質をコードするDNAを有する発現プラスミドをも提供するものである。

本発明はまた、該発現プラスミドによって形質転換された形質転換体を提供するものである。

さらに、本発明は、上記の本発明のDNAが発現することにより生産され得る腫瘍抗原としての活性を有するタンパク質を提供するものである。

そのようなタンパク質の具体例として、配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAを発現することによって得られるタンパク質が例示される。該タンパク質は、還元条件下でのSDS-PAGEにより、分子量約43キロダルトンのバンドを示す。

- 5        1つの態様では、本発明の腫瘍抗原タンパク質は、配列番号：2に記載のアミノ酸配列を含んでいる。この配列番号：2に記載のアミノ酸配列は、配列番号：1に記載の塩基配列の第590位～第922位の部分にコードされており、少なくともHLA-A26及びHLA-A24拘束性の腫瘍抗原ペプチド部分を含んでいる。

- 10        既述のごとく、配列番号：1に記載の塩基配列は、本発明者らが開示した国際公開第97/46676号パンフレットに記載の腫瘍抗原タンパク質SART-1をコードするDNA（国際公開第97/46676号パンフレットの配列番号：2に記載）の、第1517位以降の配列に一致する。また、配列番号：2に記載のアミノ酸配列は、該SART-1のアミノ酸配列（国際公開第97/46676号パンフレットの配列番号：1に記載）の第690位以降の配列に相当しており、本発明者らによって、  
15        この第690位以降の配列中には種々の腫瘍抗原ペプチド部分の存することが明らかにされている（国際公開第97/46676号パンフレット参照）。

- 20        以上のような本発明の腫瘍抗原タンパク質及び遺伝子（DNA）は、以下に詳しく述べるように、インビボ及びインビトロで腫瘍の治療、予防、診断など様々な目的に有用である。特に本発明のDNA及びその発現産物である腫瘍抗原タンパク質は、発生頻度の高い扁平上皮癌等の抗腫瘍剤、又は診断薬として広範に利用可能である。ちなみに扁平上皮癌はヒトの癌で最も多く認められる癌の一つであり、特に食道癌や肺癌での扁平上皮癌は現在の化学療法や放射線療法に比較的抵抗性を示すことが知られている。

- 25        従って本発明は、本発明のDNA又は腫瘍抗原タンパク質を有効成分とする医薬を提供するものである。

本発明の腫瘍抗原タンパク質を有効成分として含有する医薬は、細胞性免疫が効果的に成立するようにアジュバントとともに投与したり、粒子状の剤型にして投与することができる。腫瘍抗原タンパク質を生体に投与すると、抗原提示細胞のMHCクラスI抗原に腫瘍抗原ペプチドが高密度に提示され、腫瘍特異的CT

Lが効率よく増殖し、これにより腫瘍の治療又は予防が達成される。アジュバントとしては、文献 (Clin. Microbiol. Rev., 7:277-289, 1994)に記載のものなどが応用可能である。また、リポソーム製剤、直径数 $\mu\text{m}$ のビーズに結合させた粒子状の製剤、リピッドを結合させた製剤など外因性の抗原ペプチドをMHCクラス I 抗原へ効率良く抗原提示させる剤形も考えられる。投与方法としては、皮内投与、皮下投与、静脈注射などが考えられる。また、腫瘍抗原ペプチドを提示した樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞や、腫瘍抗原タンパク質をコードするDNAを導入した細胞を投与する方法も考えられる。製剤中の本発明の腫瘍抗原タンパク質の投与量は、治療すべき疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常0.0001mg~1000mg、好ましくは 0.001mg~1000mgであり、これを数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

本発明の腫瘍抗原タンパク質をコードするDNAを有効成分として含有する医薬を腫瘍患者に投与することで腫瘍を治療又は予防することができる。本発明のDNAを投与すると細胞内で腫瘍抗原タンパク質が高発現し、生じた腫瘍抗原ペプチドがMHCクラス I 抗原と結合して、細胞表面に高密度に提示される。その結果、腫瘍特異的CTLが体内で効率的に増殖され腫瘍の治療又は予防が達成される。そのような目的でDNAを投与し細胞内に導入する方法は既知であり、例えばウイルスベクターによる方法及びその他の方法 (日経サイエンス, 1994年4月号, 20-45頁、月刊薬事, 36(1), 23-48(1994)、実験医学増刊, 12(15), (1994)、及びこれらの引用文献等) があり、それらのいずれの方法も本発明に適用することができる。

ウイルスベクターによる方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンプスウイルス等のDNAウイルス又はRNAウイルスに本発明のDNAを組み込んで導入する方法が挙げられる。この中で、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルス等を用いた方法が特に好ましい。

その他の方法としては、発現プラスミドを直接筋肉内に投与する方法 (DNAワクチン法)、リポソーム法、リポフェクチン法、マイクロインジェクション法、

リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられ、特にDNAフクチン法、リポソーム法が好ましい。

5 本発明のDNAを実際に医薬として作用させるには、DNAを直接体内に導入する *in vivo*法、及びヒトからある種の細胞を採集し体外でDNAを該細胞に導入しその細胞を体内に戻す *ex vivo*法がある（日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1)、23-48(1994)、実験医学増刊、12(15)、(1994)、及びこれらの引用文献等）。いずれの方法でも本発明のDNAを適用できるが、*in vivo*法がより好ましい。

10 *in vivo*法により投与する場合、治療目的の疾患、症状等に応じた適当な投与経路で投与する。例えば、静脈、動脈、皮下、皮内、筋肉内等に投与することができる。*in vivo*法により投与する場合は、例えば、液剤等の製剤形態をとりうるが、一般的には有効成分である本発明のDNAを含有する注射剤等とされ、必要に応じて、慣用の担体を加えてもよい。また、本発明のDNAを含有するリポソーム又は膜融合リポソーム（センダイウイルス（HVJ）ーリポソーム等）に  
15 においては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリポソーム製剤の形態とすることができる。

製剤中の本発明のDNAの含量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常、0.0001mg～100mg、好ましくは0.001mg～10mgの本発明のDNAを、数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。

20 以上のような本発明のDNA及びタンパク質は、前述の医薬の他、当該研究分野における研究用試薬としても有用である。さらに、前記本発明のタンパク質は腫瘍の診断薬の有効成分とすることもできる。すなわち、本発明の腫瘍抗原タンパク質を必要に応じて標識し、腫瘍が疑われる患者から得た試料（血液、腫瘍組織など）中の抗体（腫瘍抗原タンパク質に対する抗体）の存在を検出することにより、腫瘍の有無を診断することも可能である。また、本発明のタンパク質は、  
25 後述の本発明の抗体を産生するための免疫原としても、有用である。

本明細書において「抗体」とは、本発明の腫瘍抗原タンパク質、又はその一部よりなる部分タンパク質に対する抗体を指す。該抗体は、例えばAntibodies; A Laboratory Manual, Lane, H. D.ら編, Cold Spring Harbor Laboratory Press

出版 New York 1989年などに記載の方法により容易に作製される。即ち、本発明の腫瘍抗原タンパク質又はその一部よりなる部分タンパク質を免疫原に用い、常法により適宜動物を免疫することにより、本発明の抗体を容易に作製することができる。ここで免疫原としては、本発明の腫瘍抗原タンパク質、本発明の腫瘍抗原タンパク質の一部よりなる部分タンパク質（ペプチド断片も含む）、本発明の腫瘍抗原タンパク質又はその一部よりなる部分タンパク質とGST（グルタチオン S-トランスフェラーゼ）との融合タンパク質、あるいは本発明の腫瘍抗原タンパク質又はその一部よりなる部分タンパク質とMycタグとの融合タンパク質などが挙げられる。ここで部分タンパク質の長さとしては、エピトープを構成し得る最小の長さという観点から、少なくとも8アミノ酸以上の長さのものが挙げられる。

また、本発明の腫瘍抗原タンパク質に特異的なモノクローナル抗体は、既知の方法によって作製することができる。最初コーラー及びマイルシュタイン [Kohler and Milstein, Eur. J. Immunol. 6, 511 (1976)] が示したハイブリドーマの技術は多くの特異抗原に対するモノクローナル抗体の製造に応用されており、例えば、分子生物学研究のためのタンパク実験法 第4章 羊土社 (1994)等の文献記載の手法に従って、当業者が実施可能である。

宿主動物の免疫方法又はそれから得た抗体産生細胞培養の方法及びスケジュールは、従来の確立された抗原刺激及び生産技術に従う。

得られた抗体は、既知技術、例えばイムノアフィニティクロマトグラフィー、HPLC（高速液体クロマトグラフィー）等によって精製することができる。

以上のようにして得られた抗体をもとに、種々の抗体フラグメントを作製することも可能である。該抗体フラグメントとは、例えば抗体のペプシン消化によって生成され得る  $F(ab')_2$  フラグメント、 $F(ab')_2$  フラグメントのジスルフィド結合を還元することによって生成され得る  $Fab'$  フラグメント、及び抗体をパパイン及び還元剤で処理することによって生成され得る  $2Fab$  又は  $Fab$  フラグメント等が挙げられ、これらのフラグメントも本発明の範疇に含まれる。

さらに、これらの抗体又は抗体フラグメントをもとに、種々の誘導体を作製することも可能である。ここで誘導体とは、例えばキメラ抗体、擬人化抗体が挙げ



られ、該抗体は、例えば特開昭61-47500、Nature, 321, 522 (1986)等に記載の方法に準じて作製することができる。また、前記抗体又は抗体フラグメントを酵素等で標識したのも、当該誘導体の範疇に含まれる。具体的な酵素標識法としては、例えばグルタルアルデヒド法、過ヨード法、マレイミド法、及びピリジル・ジスルフィド法が挙げられる。標識に用いられる酵素としては、例えばウシ小腸・アルカリフォスファターゼ、西洋ワサビ・ペルオキシダーゼなどが挙げられる。これらの標識抗体は、例えば、酵素免疫測定法、医学書院（1978）等の基本書に従い、当業者ならば容易に作製することができる。さらに、放射性同位元素（ラジオアイソトープ）により標識することもできる。

以上のような本発明の抗体、抗体フラグメント、又はこれらの誘導体（以下、抗体等という）は、以下に述べるような腫瘍の診断薬として利用することができる。

後述の実施例4に示すように、本発明の抗体を用い、種々の細胞株及び組織に対するウエスタンブロット解析を行ったところ、精巣及び胎児肝を除く全ての正常組織、あるいはメラノーマ、白血病では発現が認められなかったが、検討した頭頸部扁平上皮癌の全例、食道扁平上皮癌の60%、肺扁平上皮癌の50%、及び肺腺癌の50%もの症例において本発明の新規な腫瘍抗原タンパク質の発現が認められた。さらに、前記ウエスタンブロット解析で陽性を示した癌細胞（本発明の腫瘍抗原タンパク質の発現している細胞）は、実際に腫瘍特異的なCTLにより認識され傷害を受けることも明らかとなった。

このように本発明の腫瘍抗原タンパク質は、精巣及び胎児肝を除く正常組織、あるいはメラノーマ、白血病では発現が検出されず、種々の扁平上皮癌あるいは腺癌において特異的かつ高頻度に発現していた。従って本発明の腫瘍抗原タンパク質に対する抗体等は、これらの癌患者の診断に幅広く利用できるものと考えられる。また、このような抗体等を用いて本発明の腫瘍抗原タンパク質を検出することにより、腫瘍の早期発見、再発、転移の発見が可能となり、また本発明の腫瘍抗原タンパク質、腫瘍抗原ペプチド又はそれらをコードするDNAを用いた医薬の適応可能な腫瘍患者を効率的に選択することができる。その結果、腫瘍の治療及び予防に大いに役立つことが期待される。

従って、本発明は、本発明の腫瘍抗原タンパク質、又はその一部よりなる部分タンパク質に対する抗体、抗体フラグメント、又はこれらの誘導体を提供するものである。

5 本発明はまたこれらの抗体、抗体フラグメント、又はこれらの誘導体のいずれかを有効成分として含有する腫瘍の治療又は診断のための組成物を提供するものである。

さらに本発明は本発明の抗体、抗体フラグメント又はそれらの誘導体を用いて腫瘍を診断する方法をも提供する。

10 本発明の抗体等を、例えばウシ血清アルブミン含有リン酸緩衝液 (pH7.0) 等の適当な緩衝液中に存在させることにより、腫瘍の診断薬の有効成分とすることができる。本発明の診断薬を用いて免疫学的診断を行う方法としては、例えば、腫瘍組織標本から腫瘍抗原タンパク質を検出する方法、血中又は組織中の腫瘍抗原タンパク質の存在を検出する方法などが挙げられる。具体的な検出方法としては、後述の実施例4に記載のウエスタンブロット解析の他、免疫組織化学法、イ  
15 ムノブロット法、放射免疫測定法 (RIA)、酵素免疫測定法 (ELISA)、蛍光あるいは発光測定法などが挙げられる。これらの測定法の詳細については、例えば、酵素免疫測定法、医学書院 (1978) 等の基本書を参考にされたい。

20 本発明の診断薬は、測定方法に応じて、例えば酵素標識抗体、発色剤、発色補助剤、停止液、標準品等をも含有するキットの形態において使用することが可能である。

本発明の抗体等を治療に用いる場合には、例えば、本発明の腫瘍抗原タンパク質に対して特異的なモノクローナル抗体を投与するか、又は該モノクローナル抗体に制癌剤や毒素を結合させたものを癌患者に投与して、該腫瘍抗原タンパク質を発現している腫瘍細胞を死滅させる方法がある。

25 さらに、本発明の抗体等の他の用途としては、アフィニティークロマトグラフィー、cDNAライブラリーのスクリーニング等が挙げられる。

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

参考例1 食道癌細胞株に対する細胞傷害性T細胞 (CTL) 株の樹立

中尾ら著, Cancer Res., 55:4248-4252(1995)の記載に従い、組織型が扁平上皮癌に分類される食道癌細胞株KE-4に対するCTLを患者の末梢血単核球細胞から樹立し、KE-4CTLと命名して実験に使用した。食道癌細胞株KE-4及びKE-4CTLは、茨城県つくば市東1丁目1番3号、工業技術院生命工学工業技術研究所に、それぞれ受託番号FERM BP-5955及びFERM BP-5954で寄託されている（寄託日：いずれも平成9年5月23日）。また、前述の中尾らの報告に従い、KE-4のHLAクラスI分子のタイピングを行い、HLA-A2402、-A2601、-B54、-B60、-Cw1、-Cw3であることを確認した。

#### 参考例2 HLA-A2601 cDNAの調製

前記KE-4から、中尾ら著, Cancer Res., 55:4248-4252(1995)の記載に従い、HLA-A2601のcDNAを発現ベクターpCR3(INVITROGEN社製)に組み込んだ組換えプラスミドを作製した。

#### 参考例3 KE-4由来cDNAライブラリーの作製

KE-4からmRNA精製システム（ファルマシアバイオテック社製）を用い添付のプロトコールに従い、全RNA画分の分離及びoligo(dT)カラムによるpoly(A)<sup>+</sup>mRNAの調製を行った。mRNAよりスーパースクリプトプラスミドシステム(GIBCO BRL社製)を用い添付のプロトコールに従い、両端にNotIアダプターとSalIアダプターを連結したcDNAを作製した後、このcDNAを発現ベクターのプラスミドpSV-SPORT1(GIBCO BRL社製)の制限酵素NotI及びSalIの切断部位にライゲーションにより連結して組換えプラスミドを得た。この組換えプラスミドをジーンパルサー(Bio-Rad社製)を用いて25μF, 2.5kVの条件で、電気パルスにより大腸菌のエレクトロマックス DH10B/p3<sup>TM</sup>セル(GIBCO BRL社製)に導入し、アンピシリン(50μg/ml)を含むLB培地(1%バクトトリプトン、0.5%イーストエキス、0.5%NaCl、pH7.3)で組換えプラスミドが導入されている形質転換体を選択した。

#### 参考例4 インターフェロナーγの定量

インターフェロナーγ (IFN-γ)の定量は、エンザイムイムノアッセイ(ELISA)により行った。96ウェルマイクロプレートに固着化抗体として抗ヒトIFN-γマウスモノクローナル抗体を吸着させ、ウシ血清アルブミンで非特異的結

合をブロックした後、検体中のIFN- $\gamma$ を抗体に結合させた。次に検出抗体として抗ヒトIFN- $\gamma$ ウサギポリクローナル抗体を結合させ、さらにアルカリフォスファターゼ標識した抗ウサギイムノグロブリンヤギ抗体を結合した後、発色基質としてパラニトロフェニルフォスフェートを反応させ、1N NaOHを等量加えて反応を停止させた後、吸光度(405nm)を測定した。これをスタンダードのIFN- $\gamma$ で得られた値と比較することにより定量した。

#### 実施例1 新規な腫瘍抗原タンパク質遺伝子のスクリーニング

参考例3に示した形質転換体の約100個のプールからの組換えプラスミドDNAの回収は以下に行った。すなわち、アンピシリン (50  $\mu$ g/ml)を含むLB  
10 培地の入った96ウェルU底マイクロプレートにウェルあたり 100個の形質転換体  
を加え培養後、その一部をウェル当たり0.25mlのTYGPN培地(F. M. Ausubelら編、  
CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Inc.)の入った  
別の96ウェルU底マイクロプレートに移して37℃で48時間培養し、残りのLB培地  
のマイクロプレートは凍結保存した。TYGPN培地で培養した形質転換体の組換え  
15 プラスミドDNAは、マイクロプレートでアルカリ溶解法(F. M. Ausubelら編、  
CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Inc.)により調  
製した。イソプロパノール沈澱で回収した組換えプラスミドDNAは、50  $\mu$ lの  
20ng/ml RNaseを含む10mM Tris, 1mM EDTA, pH7.4溶液で懸濁した。

線維芽細胞株のVA-13 細胞(理化学研究所細胞開発銀行、Ann. Med. Exp. Biol.  
20 Fenn., 44:242-254, 1966)へ、リポフェクチン法により以下のようにKE-4 c DN  
Aの組換えプラスミドとHLA-A2601 c DNAの組換えプラスミドをダブルトラン  
スフェクトした。すなわち、VA-13細胞を96ウェル平底マイクロプレートにウェ  
ル当たり7000個を加えて、100  $\mu$ lの10% FCSを含むRPMI 1640培養液で2日間  
培養した。リポフェクチン試薬(GIBCO BRL社製)を用い、形質転換体約 100個分  
25 のKE-4 c DNAの組換えプラスミド25  $\mu$ lと参考例2に示したHLA-A2601 c DN  
Aの組換えプラスミド10  $\mu$ l(200ng)と約35倍に希釈したリポフェクチン試薬35  $\mu$   
lの混合液70  $\mu$ lの30  $\mu$ lをVA-13細胞に加えてダブルトランスフェクトした。ト  
ランスフェクタントは2点ずつ用意した。5時間後、このトランスフェクタントに  
200  $\mu$ lの10% FCSを含む培養液を加え、更に72時間、37℃で培養した後、培養液

を除去し、ウェル当たり10000個のKE-4CTLを加えて100  $\mu$  lの10%FCSと25U/mlのIL-2を含む培養液で37°Cで24時間培養した。培養液を回収し、IFN- $\gamma$ 量をELISAで測定した。

高いIFN- $\gamma$ 産生が認められた4群については、該当する凍結保存してあった  
5 KE-4 c DNAの組み換えプラスミドによる形質転換体約 100個のプールを用いて  
さらに以下のようにスクリーニングを行った。すなわち、形質転換体のプールを  
アンピシリン(50  $\mu$  g/ml)を含むLB寒天培地のプレートにまいてコロニーを得て、  
各群200コロニー、合計800コロニーについてウェル当たりの形質転換体が1種類  
となる条件で上記と同様の方法で培養し、KE-4 c DNAの組換えプラスミドDN  
10 Aを調製した。さらに上記と同様な方法で VA-13細胞へのKE-4 c DNAの組換え  
プラスミドとHLA-A2601 c DNAの組換えプラスミドのダブルトランスフェクト  
を行い、引き続いてKE-4CTLとの混合培養を行い、KE-4CTLが反応して産生した培  
養液中のIFN- $\gamma$ の定量を行って陽性のプラスミドを選択した。この操作により  
KE-4 c DNA組換えプラスミドクローンが選択された。該プラスミドクローンに  
15 ついてはさらにもう一度、同様な操作を繰り返して、KE-4CTL細胞によるIFN- $\gamma$   
の産生量を参考例4の方法により定量した。その結果を図1に示す。比較のため  
に異なったタイプのHLA (HLA-A0201) をコードするcDNAを用いて同様に実験し  
た。図中、■及び□はそれぞれHLA-A2601 c DNA及びHLA-A0201 c DNAを用  
いた結果を示す。横軸は、前記プラスミドクロンの量 (ng/well) を、また縦  
20 軸は、KE4-CTLが産生したIFN- $\gamma$ 量 (pg/ml) を示す。図1より、このプラスミ  
ドクロンのVA-13細胞へのトランスフェクションによりKE-4CTLからのIFN- $\gamma$ の  
産生が誘導されること、すなわち該プラスミドクローンは腫瘍抗原タンパク質を  
コードする遺伝子であることが明らかとなった。

#### 実施例2 新規な腫瘍抗原タンパク質遺伝子の塩基配列決定

25 実施例1で選択された腫瘍抗原タンパク質遺伝子のcDNAが組み込まれた組  
換えプラスミドを持つ形質転換体は、500 mlのアンピシリン (50  $\mu$  g/ml) を含む  
LB培地で37°Cで14~16時間培養し、遠心分離にて菌体を回収した。菌体から  
PLASMID MAXI キット(QIAGEN 社製) に従い、組換えプラスミドを回収した。c  
DNAは、SP6 RNA ポリメラーゼプロモーター配列とT7 RNAポリメラーゼプロモ

ーター配列に挟まれた部位に組み込まれている。そこで文献(DNA 4:165, 1985)に記載のSP6 プロモータープライマー及びT7プロモータープライマーを合成した。次に SP6プロモータープライマー又はT7プロモータープライマーを Fluore - dATP Labeling Mix(ファルマシアバイオテク社製) 及び AutoRead Sequencing Kit (ファルマシアバイオテク社製) と組み合わせてジデオキシシークエンシング反応を行い、蛍光DNAシーケンサー(ファルマシアバイオテク社製)を使用して、両端からcDNAの塩基配列を決定した。決定した塩基配列(1011bp)を配列番号:1に示す。なお、該配列番号:1に記載の塩基配列は、国際公開第97/46676号パンフレットに記載の腫瘍抗原タンパク質SART-1をコードするDNA(国際公開第97/46676号パンフレットの配列番号:2に記載)の、第1517位以降の配列に一致するものである。

### 実施例3 新規な腫瘍抗原タンパク質に対する抗体の作製

実施例2で得られた新規な腫瘍抗原タンパク質遺伝子のcDNAが組み込まれた組換えプラスミドを、2種類のプライマー、sf-1:5'-TG GGAATTCGATGAGGATCCCGAGC-3'、sr-1:5'-TACGGGCGGCCGCTGTCACTTGGT-3'を用いてPCR法で増幅した。この増幅断片は、配列番号:1に記載の塩基配列の第146位~第930位の部分配列を有している。

この増幅断片を制限酵素EcoRI及びNotIで切断し、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質を発現させるプラスミドベクターpGEX-5X-3(ファルマシアバイオテク社)のEcoRI及びNotI部位に連結して、組換えプラスミドを得た。該組換えプラスミドを大腸菌DH5αに導入し、形質転換体を選択した。該形質転換体を大量培養し、タンパク分解酵素阻害剤であるPMSF及びアプロチニンの存在下で、超音波により、菌体を破壊して本発明の腫瘍抗原タンパク質とGSTとの融合タンパク質を抽出した。その後、グルタチオンセファロース4B(ファルマシアバイオテク社)を用いたアフィニティー精製及びSuperrose12(ファルマシアバイオテク社)を用いたゲル濾過精製により、該融合タンパク質を単離した。単離した融合タンパク質を抗原に用いて、常法によりウサギを免疫し、抗血清を得た。

#### 実施例4 ウェスタンブロット解析

実施例3で得られた抗血清を用いたウェスタンブロットにより、本発明の腫瘍抗原タンパク質の細胞株及び組織での発現を調べた。

まず、種々の細胞株及び組織を0.2 mM PMSF、0.03 TIU/mlアプロチニンを含む10mM Tris-HCl, pH7.4, 150mM NaCl, 0.5% Triton X-100に溶解し、超音波処理した後、14,000 rpmで20分間遠心した。上清をSDS-PAGE法にて電気泳動をした後、Hybond-PVDFメンブレン（アマシャム社）に転写し、適当量の実施例3で得られた抗血清とともに室温で4時間インキュベートした。その他のウェスタンブロットの方法は、七條ら著、Journal of Immunological Methods, 186: 137 (1995)に記載の方法に従った。

結果を図2に示す。実施例3で得られた抗血清は免疫に用いた70 kDの融合タンパク質を認識し、酵素Factor Xにより融合タンパク質をGSTと腫瘍抗原タンパク質に切断した場合、27 KDのGSTとともに43 KDの腫瘍抗原タンパク質を認識した（図2A）。各種細胞、組織での腫瘍抗原タンパク質の発現を調べた結果、細胞では、健康人末梢血単核球（PBMC）5例、白血病細胞株16例及びメラノーマ細胞株2例の全例で発現が検出されなかったが、頭頸部扁平上皮癌細胞株5例中3例、食道扁平上皮癌細胞株6例中4例、肺扁平上皮癌細胞株3例中全例、肺腺癌細胞株6例中3例で発現が認められた。また正常組織では、胎児肝臓1例及び精巣3例の全例で発現が認められたが、新生児肝臓1例、成人肝臓1例、子宮2例、食道4例及び膵臓1例の全例で発現が検出されなかった。また癌組織では、白血病10例及びメラノーマ10例の全例で発現が検出されなかったが、頭頸部扁平上皮癌7例中全例、食道扁平上皮癌30例中18例、肺扁平上皮癌17例中8例、肺腺癌35例中16例で発現が認められた。これらの結果の一例を図2（B）に示す。以上のように、本発明の新規な腫瘍抗原タンパク質は、種々の扁平上皮癌あるいは腺癌において特異的かつ高頻度で発現していたことから、本発明の新規腫瘍抗原タンパク質に対する抗体は、これらの癌細胞及び癌患者の診断に応用できるものと考えられる。

#### 実施例5 各種癌細胞における腫瘍抗原タンパク質の発現、及びCTLによる細胞傷害活性の測定

国際公開第97/46676号パンフレットの配列番号：2に記載の塩基配列を有する組換えプラスミド（K3）（FERM BP-5951）をEcoRI及びNotI処理して得られたDNA断片を、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）との融合タンパク質を発現させるプラスミドベクターpGEX-4T-2（ファルマシアバイオテック社）のEcoRI及びNotI部位に連結して、組換えプラスミドを得た。該プラスミドより、実施例3と同様な方法によりGSTとの融合タンパク質及びそれに対する抗血清を作製した。この抗血清は、国際公開第97/46676号パンフレットに記載の腫瘍抗原タンパク質（分子量約125キロダルトン）を認識するものである。この分子量約125キロダルトンのタンパク質に対する抗血清と、実施例3で得られた分子量約43キロダルトンの本発明の腫瘍抗原タンパク質に対する抗血清とを用いて、実施例4に記載した方法に従いウエスタンブロットを行い、各種HLA-A24陽性癌細胞株での発現を調べた。他方、KE-4CTLの各種癌細胞に対する細胞傷害性を、D. D. Kharkevitchら著、Int. J. Cancer, 58:317(1994)に記載の方法に従って測定した。その際、<sup>51</sup>Crで標識した癌細胞10<sup>4</sup>個の標的細胞に対し、KE-4CTL 2×10<sup>5</sup>個を作用させた。これらの結果を以下の表1に示す。

表 1

細胞株	由来	43kDタンパク質発現	125kDタンパク質発現	細胞傷害性(%)
KE-4	食道癌	+	+	27
KE-3	食道癌	+	+	32
TE-8	食道癌	+	+	23
TE-11	食道癌	+	+	31
PC9	肺癌	+	+	39
11-18	肺癌	+	+	27
SKG-1	子宮癌	+	+	25
TE-10	食道癌	—	+	38
LU65A	肺癌	—	+	6
RERF-LC-AI	肺癌	—	+	3
LK79	肺癌	—	+	3



\* ウェスタンブロットによりバンドが認められた場合を+、認められなかった場合を-と表した。

表1に示すように、125kDのタンパク質は、検討した癌細胞の全てに発現が認められた。それらの細胞株のうち、43kDのタンパク質が発現している癌細胞株に対しては、KE-4CTLが傷害活性を示しているが、該43kDのタンパク質が発現していない癌細胞株については、TE-10の場合を除いてKE-4CTLが傷害活性を示さなかった。これらの結果より、43kDタンパク質由来の抗原ペプチドは、125kDタンパク質由来の抗原ペプチドよりも、より効率的に抗原提示されCTLに認識される傾向にあることが考えられ、43kDタンパク質に対する抗体は、本発明の腫瘍抗原タンパク質、その腫瘍抗原ペプチド、又は腫瘍抗原タンパク質をコードするDNAによる治療効果の期待できる癌患者の診断に、より有用であると考えられた。

#### 産業上の有用性

本発明の種々の扁平上皮癌あるいは腺癌で高頻度に発現している新規な腫瘍抗原タンパク質及びその遺伝子、並びに該新規な腫瘍抗原タンパク質に対する抗体は、広範な腫瘍の予防、治療又は診断に有用である。

## 請 求 の 範 囲

1. 以下の (a) 又は (b) の DNA :
  - (a) 配列番号 : 1 に記載の塩基配列で示される DNA ; 又は
  - (b) 配列番号 : 1 に記載の塩基配列で示される DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ腫瘍抗原としての活性を有するタンパク質をコードする DNA。
2. 請求項 1 記載の DNA を有する発現プラスミド。
3. 請求項 2 記載の発現プラスミドによって形質転換された形質転換体。
4. 請求項 1 記載の DNA が発現することにより生産される腫瘍抗原タンパク質。
5. SDS-PAGE (還元条件下) による分子量測定で約 43 キロダルトンのバンドを示す、請求項 4 記載の腫瘍抗原タンパク質。
6. 配列番号 : 2 に記載のアミノ酸配列を含む、請求項 4 又は 5 記載の腫瘍抗原タンパク質。
7. 請求項 1 記載の DNA 又は請求項 4 ~ 6 いずれか記載のタンパク質を有効成分として含有する医薬。
8. 請求項 1 記載の DNA 又は請求項 4 ~ 6 いずれか記載のタンパク質を有効成分として含有する腫瘍の診断薬。
9. 請求項 4 ~ 6 いずれか記載の腫瘍抗原タンパク質、又はその一部よりなる部分タンパク質、に対する抗体、抗体フラグメント、又はこれらの誘導体。
10. 請求項 9 記載の抗体、抗体フラグメント、又はこれらの誘導体のいずれかを有効成分として含有する腫瘍の診断薬。
11. 請求項 4 ~ 6 いずれか記載の腫瘍抗原タンパク質、又はその一部よりなる部分タンパク質、に対する抗体、抗体フラグメント、又はこれらの誘導体のいずれかをを用いることを特徴とする腫瘍の診断方法。
12. 請求項 1 記載の DNA を有する発現プラスミドで宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を該 DNA の発現に適した条件下で培養し、得られた培養物中の腫瘍抗原としての活性を有する発現産物を抗原として用いることにより得ることができる抗体、又は該腫瘍抗原としての活性を有するタンパク質を認識するそのフラグメント又はそれらの誘導体。

Fig. 1

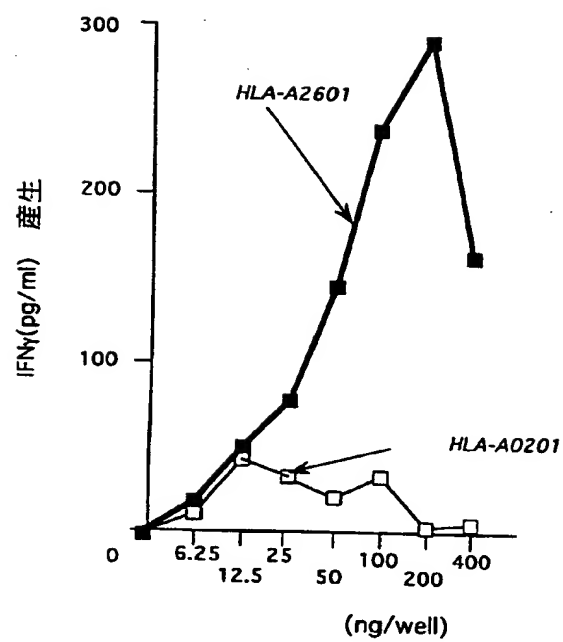
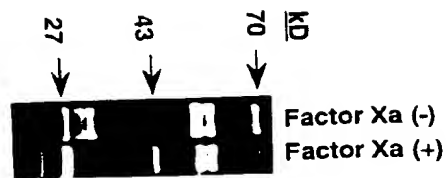
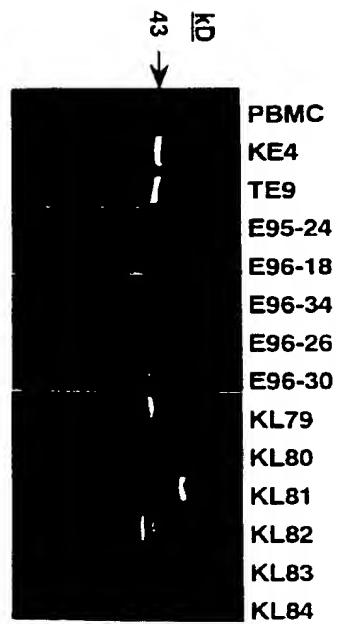


Fig. 2

**A**



**B**



## SEQUENCE LISTING

<110> ITOH, Kyogo

<120> Tumor Antigen Protein, Gene Encoding the Same and the Use Thereof

<130> 661093

<160> 4

<210> 1

<211> 1011

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
cgaggcggag ctggagctgc agaagcagct ggagaaggga cgccggctgc gacagttaca   60
gcagctacag cagctgcgag acagtggcga gaaggtggtg gagattgtga agaagctgga   120
gtctcgccag cggggctggg aggaggatga ggatcccag cggaaggggg ccatcgtgtt   180
caacgccacg tccgagttct gccgcacctt gggggagatc cccacctacg ggctggctgg   240
caatcgcgag gaggcaggagg agtcatgga ctttgaacgg gatgaggagc gtcagccaa   300
cgggtggctcc gaatctgacg gggaggagaa catcggctgg agcacggtga acctggacga   360
ggagaagcag cagcaggatt tctctgcttc ctccaccacc atcctggacg aggaaccgat   420
cgtgaatagg gggctggcag ctgccctgct cctgtgtcag aacaaagggc tgctggagac   480
cacagtgcag aaggtggccc gggtaaggc cccaacaag tcgtgccct cagccgtgta   540
ctgcatcgag gataagatgg ccatcgatga caagtacagc cggagggagg aataccgagg   600
cttcacacag gacttcaagg agaaggacgg ctacaaaccc gacgttaaga tcgaatacgt   660
ggatgagacg ggccggaaac tcacacccaa ggaggctttc cggcagctgt cgcaccgctt   720
ccatggcaag ggctcaggca agatgaagac agagcggcgg atgaagaagc tggacgagga   780
ggcgctcctg aagaagatga gctccagcga cagccccctg ggcaccgtgg ccctgctcca   840
```

ggagaagcag aaggctcaga agacccccta catcgtgctc agcggcagcg gcaagagcat 900  
 gaacgcgaac accatcacca agtgacagcg ccctcccgtg gtcggccctg cctcaacctt 960  
 catattaaat aaagctccct ccttattttt aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 1011

<210> 2

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Glu Tyr Arg Gly Phe Thr Gln Asp Phe Lys Glu Lys Asp Gly Tyr Lys			
	5	10	15
Pro Asp Val Lys Ile Glu Tyr Val Asp Glu Thr Gly Arg Lys Leu Thr			
	20	25	30
Pro Lys Glu Ala Phe Arg Gln Leu Ser His Arg Phe His Gly Lys Gly			
	35	40	45
Ser Gly Lys Met Lys Thr Glu Arg Arg Met Lys Lys Leu Asp Glu Glu			
	50	55	60
Ala Leu Leu Lys Lys Met Ser Ser Ser Asp Thr Pro Leu Gly Thr Val			
	65	70	75
Ala Leu Leu Gln Glu Lys Gln Lys Ala Gln Lys Thr Pro Tyr Ile Val			
	85	90	95
Leu Ser Gly Ser Gly Lys Ser Met Asn Ala Asn Thr Ile Thr Lys			
	100	105	110

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

WO 99/33977

PCT/JP98/05809

<400> 3

tggaattcg atgaggatcc cgagc

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

tacgggcggc cgctgtcact tggt

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/05809

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>6</sup> C12N15/12, C12N5/10, A61K31/70, G01N33/563, C07K14/82, 16/32 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>6</sup> C12N15/12, C12N5/10, A61K31/70, G01N33/563, C07K14/82, 16/32 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) DDBJ/GenBank/EMBL, WPI/L		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 97/46676, A1 (Kyogo Itoh), 11 December, 1997 (11. 12. 97) & AU, 9730479, A	1-10, 12
A	Shichijo, S., et al., "A Gene Encoding Antigenic Peptides of Human Squamous Cell Carcinoma Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes", Journal of Experimental Medicine, Vol. 187, No. 3 (1998), pages 277-278	1-10, 12
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 March, 1999 (10. 03. 99)		Date of mailing of the international search report 23 March, 1999 (23. 03. 99)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.



## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 98/05809

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>°</sup> C12N15/12, C12N5/10, A61K31/70, G01N33/563,  
C07K14/82, 16/32

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>°</sup> C12N15/12, C12N5/10, A61K31/70, G01N33/563,  
C07K14/82, 16/32

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
DDBJ/GenBank/EMBL, WPI/L

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 97/46676, A1 (伊東恭悟), 11. 12月. 19 97 (11. 12. 97) & AU, 9730479, A	1-10, 12
A	Shichijo, S., et al. "A Gene Encoding Antigenic Peptides of Human Squamous Cell Carcinoma Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes", Journal of Experimental Medicine, Vol. 187, No. 3 (1998), pages 277-278	1-10, 12

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

10. 03. 99

国際調査報告の発送日

23.03.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

村上 騎見高

印

4B

8827

電話番号 03-3581-1101 内線 3448